ÉTUDE IN VITRO DES PHASES INITIALES DE DÉGRADATION DU DURAMEN DE PIN SYLVESTRE PAR LE TRAMETE DU PIN : TRAMETES PINI (THORE) FR.

par Danièle DIROL*

RÉSUMÉ. - La dégradation de la paroi cellulaire du bois parfait de Pin sylvestre par *Trametes pini* (Thore) Fr. agent de pourriture alvéolaire, est étudiée après des périodes d'exposition à ce champignon variant de deux à quatorze semaines. L'observation du bois montre que le plan ligneux est très rapidement envahi par deux sortes d'hyphes dont les plus larges émettent des diverticules à leur extrémité ou latéralement. Ces «microhyphes» perforent la paroi cellulaire abondamment. L'action enzymatique du champignon se manifeste également par la formation de creux sous forme de trace d'hyphe dans le fond de la paroi. Après six à huit semaines d'exposition commence la délignification de la paroi, laissant en relief les microfibrilles de cellulose. L'action destructrice de ce champignon est lente puisqu'après trois mois d'exposition la cellulose demeure intacte. Les observations sont faites en microscopie optique et électronique à balayage.

SUMMARY. - The degradation of Scots pine heartwood cell walls by *Trametes pini*, a white - pocket - rot fungus is observed after various periods of exposure from two weeks to fourteen weeks. The observations show that two kinds of hyphae rapidly invade the wood tissues. The larger ones grow diverticles from the tip or from the sides. Numerous bore - holes appear resulting from the action of these «perforating hyphae». The enzymatic action of the fungi also occurs by lysis zones along the hyphae. After six or eight weeks of exposure the decomposition of lignin in the cell wall begins first; the microfibrils of the cellulose are unmasked. The decay of wood by this fungus is slow since after three months of exposure, cellulose is not yet removed. Investigations are made by light microscopy and scanning electron microscopy.

---

* Centre Technique du Bois, Laboratoire de Mycologie, 10 avenue de Saint-Mandé, 75012 Paris.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog. Mycol.)* TOME I (1980).

1. INTRODUCTION

Le Tramete du Pin : *Trametes pini* (Thore) Fr. = *Fomes pini* (Thore) Karst. = *Xanthochrous pini* (Thore) Pat. = *Phellinus pini* (Thore ex. Fr.) Pilat, est un champignon lignivore appartenant à la classe des Basidiomycètes, et responsable de pourriture fibreuse blanche. Contrairement à *Coriolus versicolor* (voir DIROL, 1976) qui dégrade simultanément les constituants de la paroi cellulaire, ce champignon décompose en premier lieu la lignine et bien plus tardivement les composés cellulosiques. Il dégrade le duramen de nombreux résineux (pin sylvestre tout particulièrement), la phase finale de son action destructrice aboutit à la formation de cavités de forme ellipsoïdale de couleur blanche et orientées selon l'axe des fibres. Pour cette raison la pourriture engendrée par ce champignon est qualifiée de pourriture blanche alvéolaire.

Ce travail fait suite à celui effectué sur *Coriolus versicolor* (voir référence plus haut) et sur *Serpula lacrymans* (DIROL, 1978) afin d'activer l'étude de l'ultrastructure du bois dégradé *in vitro* respectivement par des représentants des trois grands types de pourriture (blanche simultanée, cubique, blanche alvéolaire).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

La méthode est la même que celle utilisée dans les deux précédentes études. Des cubes stériles de bois parfait (duramen) de pin sylvestre : *Pinus sylvestris* (L.) sont confrontés à une culture de *Trametes pini* pendant des périodes s'échelonnant entre deux et quatorze semaines.

Les coupes microscopiques effectuées en vue de l'observation en microscopie optique sont colorées selon la méthode de Cartwright. Les échantillons ne sont pas fixés et les observations en microscopie électronique à balayage sont faites avec un microscope ISI 60.

3. PREMIERS STADES D'ALTÉRATION DU BOIS

3.1. Envahissement du plan ligneux

Après deux semaines d'exposition du bois à la culture de *Trametes pini*, la colonisation du plan ligneux par les hyphes est importante tout particulièrement dans le bois final où les filaments mycéliens sont répartis uniformément dans les trachéides verticales et le parenchyme des rayons ligneux. Dans le bois initial les hyphes sont également nombreuses mais des plages du plan ligneux sont souvent exemptes d'hyphes. Dans les fibres, les filaments de *Trametes pini* ont un trajet rectiligne mais des bifurcations peuvent avoir lieu brusquement; une branche de l'hyphe pénètre alors dans la paroi cellulaire perpendiculairement, à la faveur de ponctuations aréolées (Pl. I, A et C). Dans le paren-

chyme des rayons ligneux les filaments se propagent grâce aux larges ponctuations simples pinoïdes.

L'installation du champignon dans les éléments ligneux a donc lieu très rapidement puisqu'après deux semaines d'attaque, la colonisation est effective.

3.2. Description du mycélium colonisateur

Les hyphes de *Trametes pini* réparties uniformément dans le bois sont de deux sortes. La picroaniline (coloration de Cartwright) colore en bleu des hyphes fines et ramifiées. D'autres hyphes bien plus larges sont légèrement colorées en rose par la safranine lors de la préparation des coupes destinées à l'observation en microscopie optique. Leur diamètre est sensiblement le double de celui des hyphes fines normales (Pl. I, A, B et C). Ces hyphes émettent des ramifications souvent très rapprochées formant des lacets ou circonvolutions ainsi que des sortes de bourgeons assez courts bien visibles en microscopie électronique (Pl. I, B).

Après deux semaines d'exposition les deux types d'hyphes sont trouvés dans les mêmes proportions dans le plan ligneux; de plus une sorte d'hyphe peut «cohabiter» à côté de l'autre variété dans une même fibre (Pl. I, C).

3.3. Premières manifestations enzymatiques

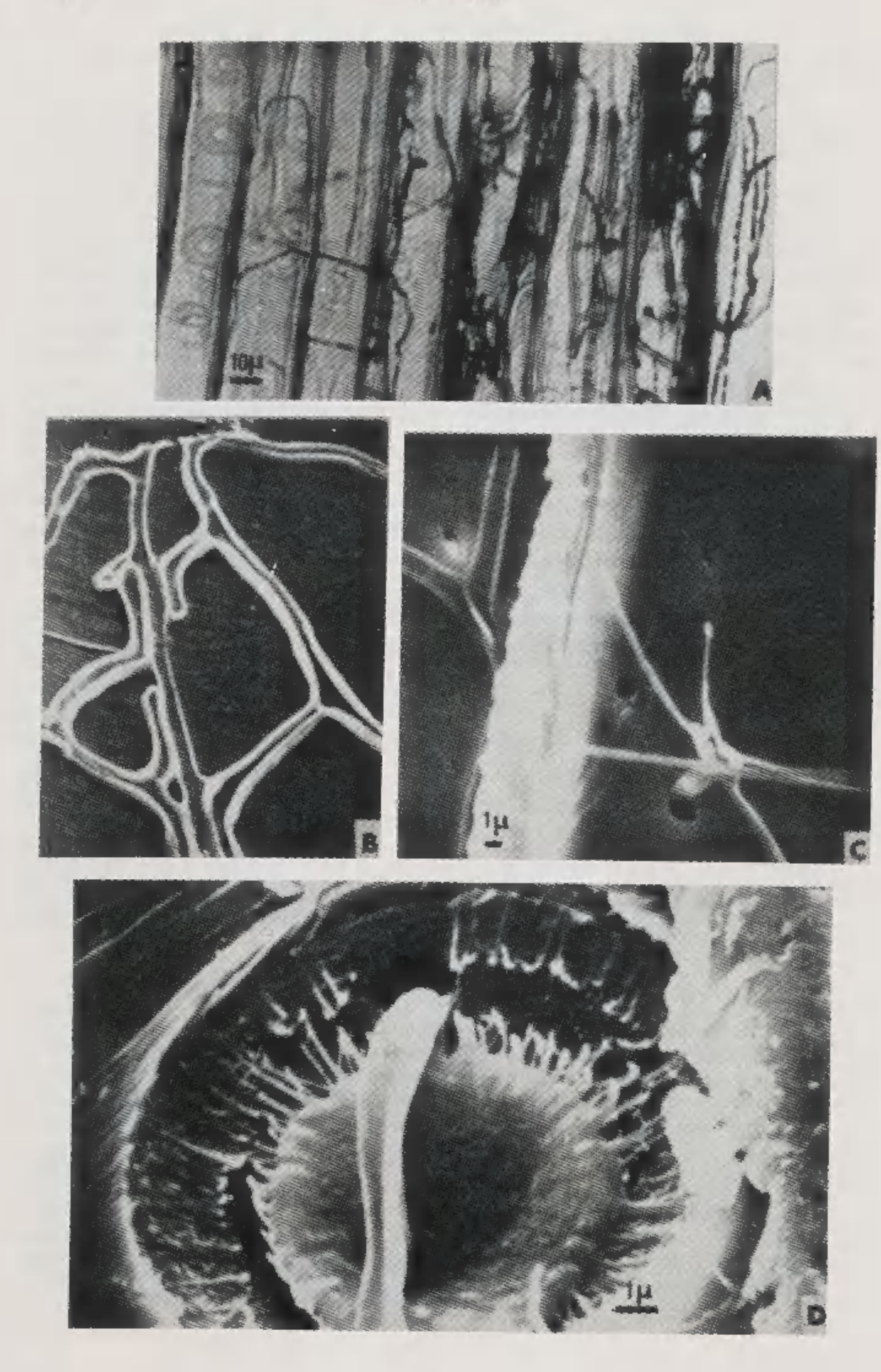
Après deux semaines d'exposition, des figures de dégradation de la paroi, montrant que la phase de colonisation du bois est dépassée, apparaissent. Comme chez *Coriolus versicolor*, de nombreuses perforations des parois cellulaires sont observées dans les trachéides verticales (Pl. I, C et D). Les enzymes capables de dissoudre la paroi cellulaire entrent donc en action après seulement deux semaines d'exposition in vitro; dans la nature le phénomène doit survenir encore plus rapidement, le champignon n'ayant que le bois comme source de nutrition.

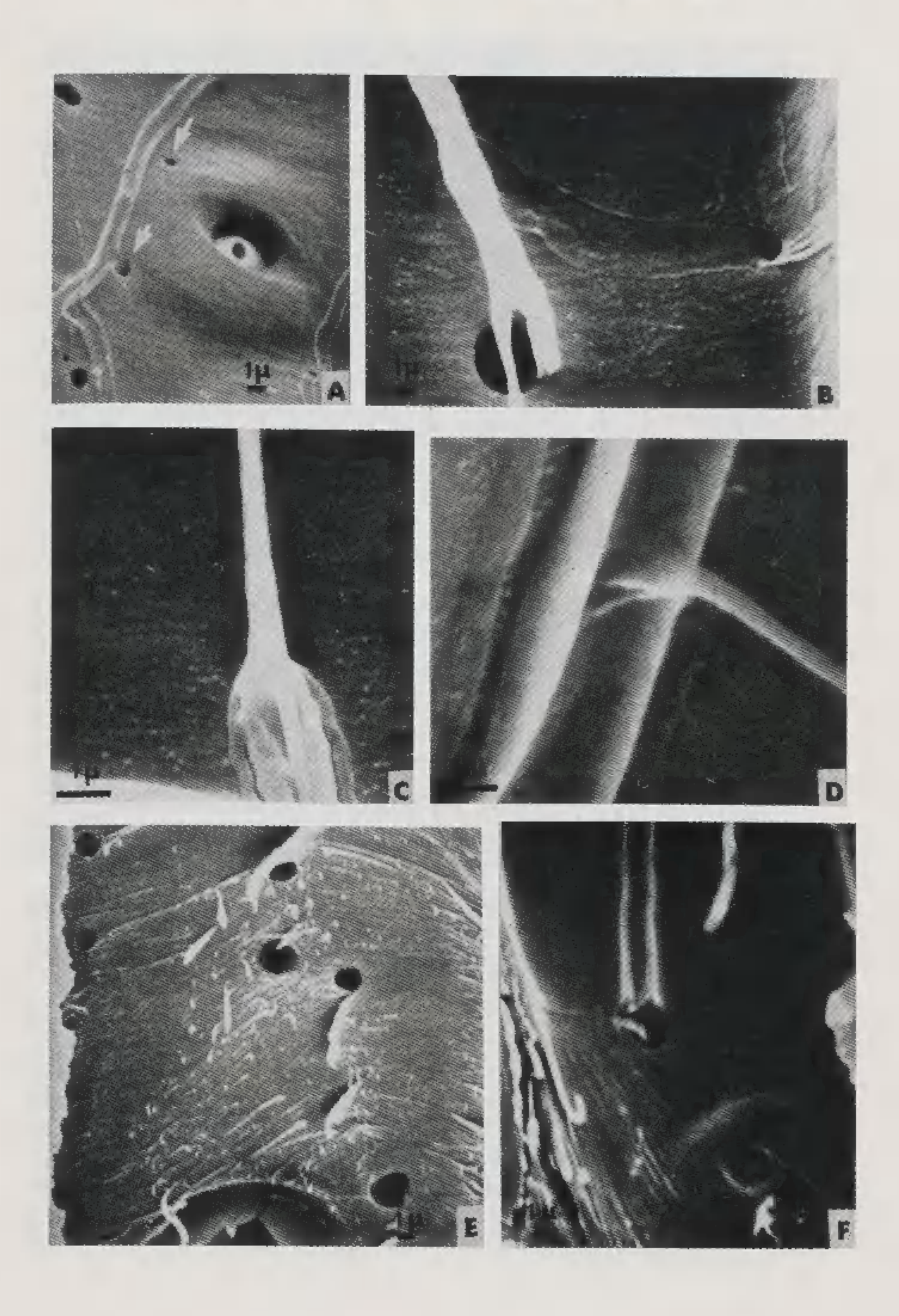
Après quatre à six semaines d'exposition, il est à remarquer que des perforations apparaissent très fréquemment à la base des ponctuations aréolées, souvent en plusieurs points au niveau de l'aréole (Pl. II, A; Pl. IV, B). Ce phéno-

---

Pl. I. – Coupes radiales. A: Envahissement abondant du plan ligneux par les deux sortes d'hyphes après deux semaines d'exposition. M.O. - B: Hyphes larges formant des boucles sur le fond de la paroi. MEB. - C: Deux sortes d'hyphes et formation de perforations après deux semaines d'exposition. MEB. - D: Hyphe créant une perforation dans la marge d'une ponctuation aréolée après quatre semaines d'attaque. MEB.

Pl. II. – Coupes radiales. A: Perforations de différents diamètres dont une créée par le diverticule latéral d'une hyphe large. MEB. - B: Deux perforations de diamètres différents. Traces d'une hyphe sur le fond de la paroi cellulaire après six semaines d'exposition. MEB. - C: Diverticule issu de l'apex d'une hyphe. MEB. - D: Diverticule latéral issu d'une hyphe large. Trace d'une hyphe dans le fond de la paroi. MEB. - E: Nombreuses perforations de tous diamètres dans le fond de la paroi d'une fibre déjà altérée après six semaines d'exposition. MEB. - F: Deux types d'hyphes créant des perforations.


10µ
A
B
1µ
C
1µ
D


1µ
A
1µ
B
1µ
C
D
1µ
E
F

mène est rare car en général, les champignons lignivores atteignent directement le torus en empruntant l'ouverture centrale de la chambre de la ponctuation.

Trametes pini possédant deux sortes d'hyphes, il est intéressant de déterminer quelles sont les hyphes perforantes.

4. MISE EN ÉVIDENCE DE PHÉNOMENES ENZYMATIQUES PONCTUELS

4.1. Perforations de différents diamètres

Après quatre semaines d'exposition, le plan ligneux est hautement perforé. Les «trous» pratiqués par les hyphes ont des diamètres fort différents; certains sont le double d'autres (Pl. II, A, B, E et F); ce phénomène n'a pas été observé chez *Coriolus versicolor* où les diamètres des perforations sont constants. Cette constatation suppose soit une activité enzymatique variable de l'hyphe (secrétion plus ou moins importante d'enzymes dissolvant la paroi) ou bien une activité perforante effectuée par des hyphes, elles-mêmes de diamètres différents. L'observation du mycélium de *Trametes pini* constitué d'hyphes d'épaisseurs variables et de fines ramifications donne à penser qu'il est, de par son action enzymatique,à l'origine des perforations de taille irrégulière.

4.2. Formations hyphales liées à l'activité enzymatique

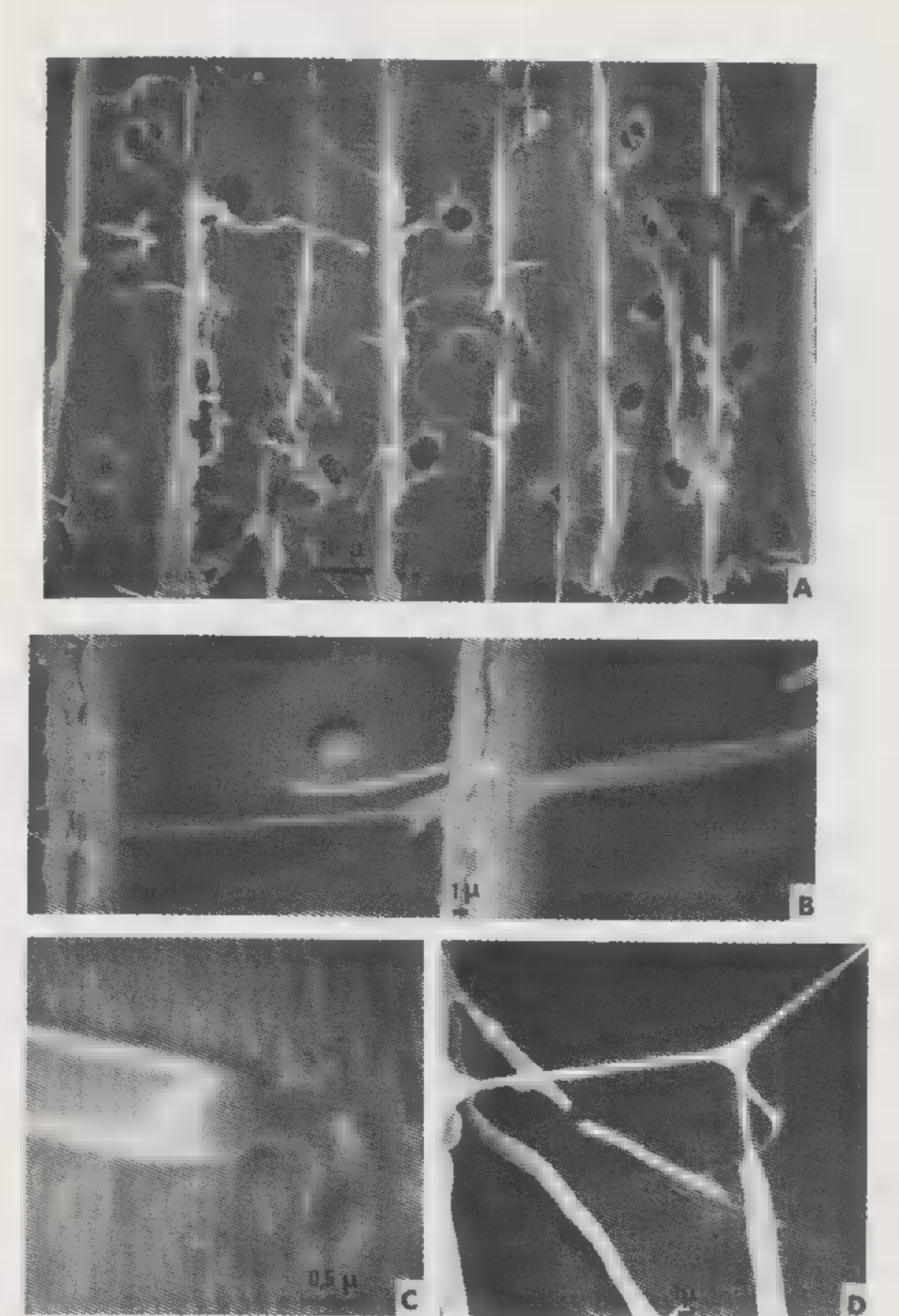
La photographie F de la planche II montre que les hyphes larges hyalines comme les plus fines sont capables de créer des perforations dans la paroi cellulaire; d'où une première explication aux différences de diamètre des perforations.

Les hyphes larges perforent la paroi de façon très particulière. Il ne semble pas qu'elles creusent la paroi directement par l'extrémité du filament mycélien, mais qu'elles émettent à partir de l'apex un fin diverticule que LIESE et SCHMID (1962-1966), appellent «microhyphes» (Pl. II, C et Pl. III, B et D). Selon ces auteurs le passage hyphe à microhyphes a lieu brusquement.

De même, toujours à partir de ces hyphes larges sont émis latéralement des diverticules très fins (Pl. II, D). Ces microhyphes, qu'elles soient issues de l'apex ou latérales, sont difficilement visibles dans le lumen cellulaire car elles semblent le plus souvent plonger perpendiculairement dans la paroi dès leur émission (Pl. II, A, cf. ⟶). A ce sujet la photographie C de la planche III montre à un très fort grossissement la dissolution enzymatique à partir de l'apex du filament; on devine la formation du diverticule perforant. Une fois que la micro-

---

Pl. III. — Coupes radiales. A: Délignification de la paroi des trachéides laissant apparaître les microfibrilles de cellulose après six semaines d'exposition. MEB. - B: Franchissement de la paroi par une hyphe à l'aide du diverticule perforant. MEB. - C: Détail de l'extrémité d'une hyphe contre la paroi qui montre des traces de dissolution. MEB. - D: Microhyphe et ramifications. MEB.


A
1 μ
B
0,5 μ
C
1μ
D

hyphe terminale a pénétré dans la paroi elle trace le chemin de l'hyphe large elle-même qui, à son tour pénètre dans la paroi et laisse derrière elle une perforation de diamètre plus important (voir Pl. III, B, le franchissement de la paroi).

A partir d'un temps d'exposition plus important (six semaines) des traces d'hyphes (zones lytiques selon LIESE et SCHMID, 1966; LIESE, 1970) sont observées sur le fond des parois. La photographie B de la planche II en montre une en particulier, très large, formant une «rigole» dans la couche bordant le lumen cellulaire. Cette trace est également visible sur la photographie D de la même planche sous-jacente et plus large que l'hyphe encore présente. Ainsi, l'activité enzymatique aurait lieu également semble-t-il par toute la surface de l'hyphe qui se trouve de cette façon imprimée dans la paroi, altérant de ce fait la première couche (S_3) de la paroi secondaire. De l'observation de la photographie B de la planche II, on peut à la suite des constatations précédentes sur les microhyphes, se représenter un de ces diverticules issus latéralement de l'hyphe large dont la trace est imprimée. Ce diverticule aurait pénétré la paroi à angle droit y créant la petite perforation.

5. LARGE DIFFUSION DE L'ACTION ENZYMATIQUE ET DÉLIGNIFICATION PROGRESSIVE DE LA PAROI

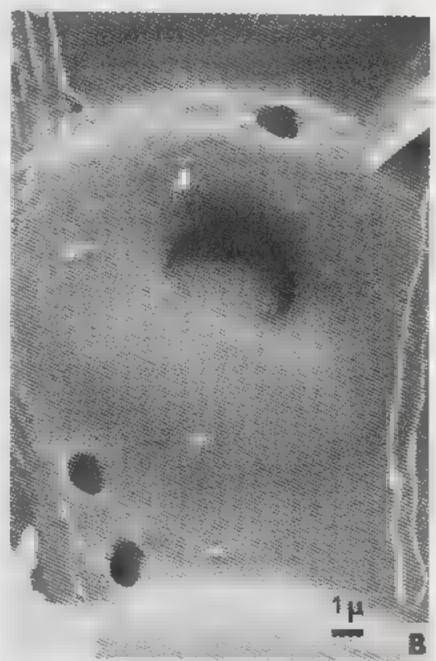
La paroi cellulaire est formée de différentes couches constituées de cellulose et de lignine en proportions variables.

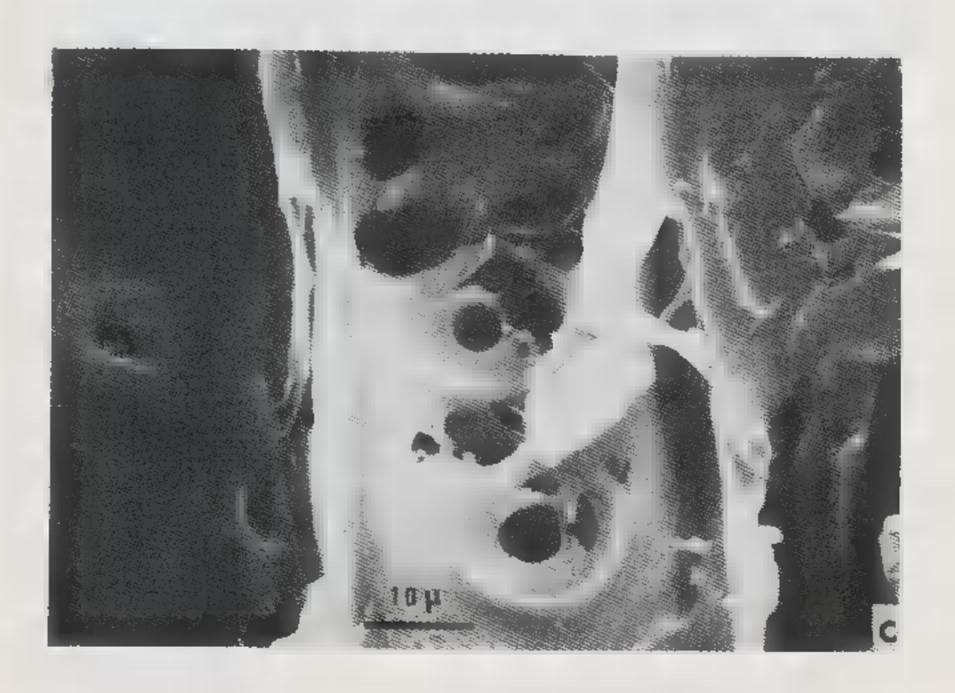
Dans toutes les couches, la lignine se présente sous forme d'une substance amorphe alors que la cellulose cristalline est constituée de microfibrilles à orientation variable selon les couches. Les deux constituants sont intimement liés, la lignine incrustant les microfibrilles de cellulose.

A partir de six semaines d'exposition, survient un phénomène nouveau; les microfibrilles de cellulose sont bien visibles à partir de la lumière; l'orientation observée correspondant à la couche atteinte par l'activité destructrice du champignon (Pl. II, E et F). Les microfibrilles de cellulose sont démasquées parce que la substance amorphe, qui dans du bois sain les enrobe, a disparu. Il s'agit de la lignine qui, très rapidement est assimilée par *Trametes pini*. La photographie A de la planche III montre bien la disparition de cette lignine incrustante par la mise en relief dans le fond des parois des trachéides, des microfibrilles de cellulose. Si l'on considère plusieurs trachéides, différentes orientations sont observées indiquant que la délignification n'est pas uniquement localisée à la couche S_3 bordant la lumière.

Pl. IV. — A, coupe tangentielle, B et C, radiales. - A: Délignification des fibres montrant un fond de paroi foncé granuleux au microscope optique. MO. - B: Ponctuation aréolée, perforée à la base de l'aréole en plusieurs points. L'hyphe a également perforé le torus. MEB. - C: Fibres de bois initial montrant une très grande fragilité principalement au niveau des ponctuations aréolées. MEB.


10µ
A


1µ
B


10µ
C

En microscopie optique, cette délignification apparaît dans le fond des fibres sous forme de cavités sombres, assez bien délimitées, où la structure fibrillaire est sans orientation précise (Pl. IV, A).

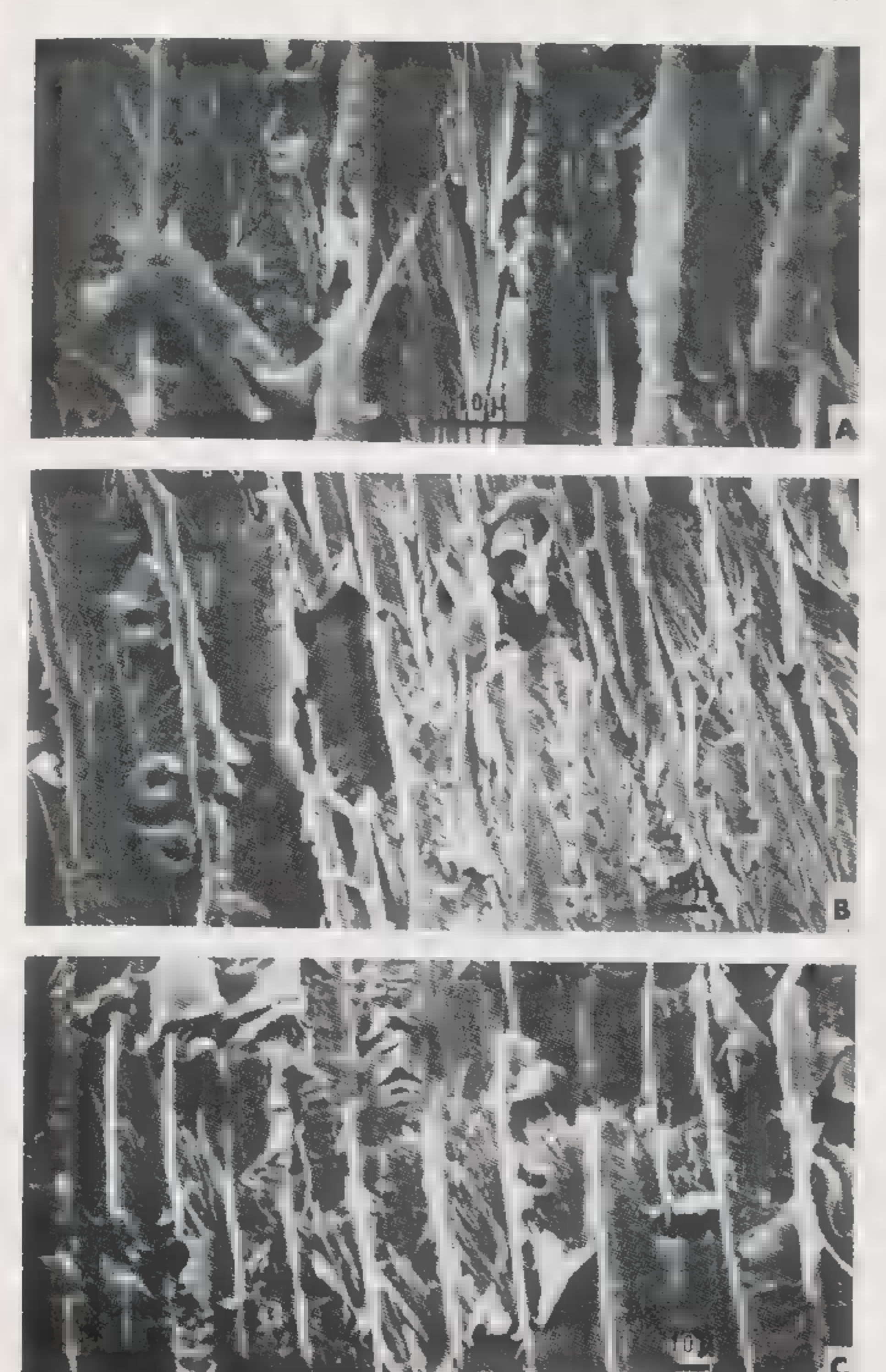
Après des périodes d'exposition plus longues (dix à quatorze semaines), le phénomène de dissolution de la lignine s'accentue, atteignant toutes les couches de la paroi. Selon MEIER (1955) la lignine de la lamelle moyenne serait elle-même atteinte. Les photographies A, B, C de la planche V montrent la progression de l'altération. Sur la première, différentes orientations sont visibles, bien que la couche S_2 domine, on devine la couche S_1 dans une trachéide, une formation en éventail est observée également qui pourrait être un résidu de la couche S_3. La photographie B montre une limite bois final - bois initial dans laquelle le bois de printemps, encore envahi par les hyphes, est perforé; par contre le bois final a la structure très perturbée des fibres délignifiées dans laquelle la charpente cellulosique orientée est bien visible.

Il semblerait que le bois final présente une altération plus conséquente que le bois initial, d'ailleurs cette observation a été faite par LIESE (1970). LIESE et SCHMID (1966) observent également beaucoup plus de perforations dans le bois final que dans le bois initial. Ce phénomène est probablement dû à une différence de lignification des deux types de trachéides. Cependant, après 14 semaines d'exposition le bois initial est abondamment perforé de larges trous pratiqués dans la paroi et l'aréole de certaines ponctuations est très endommagée. Il est bien évident que ces cellules délignifiées sont très fragiles et que les microfibrilles de cellulose mises à nu doivent être arrachées lors de la préparation des échantillons. On arrive ainsi à des figures de dégradation extrêmes (Pl. V, C) où des lambeaux d'amas de microfibrilles ayant appartenu à la couche S_2 recouvrent par endroits la membrane primaire et même la lamelle moyenne. Ce type d'altération, bien que plus important dans le bois final, apparaît également en certaines plages du bois initial après quatorze semaines d'exposition à *Trametes pini*.

6. DISCUSSION

Les observations faites *in vitro* sur du bois exposé à *Trametes pini* selon des périodes s'échelonnant entre deux et quatorze semaines, ne reflètent pas celles que l'on peut faire macroscopiquement. En effet, jusqu'à quatorze semaines d'exposition, rien ne laisse deviner la formation de cavités blanchâtres fibrillaires typiques de la pourriture alvéolaire.

Pl. V. – Coupes radiales. A: Bois final dégradé après dix semaines d'exposition. Délignification de la paroi, laissant appapaître la cellulose. MEB. - B: Limite bois final - bois initial après douze semaines d'attaque. MEB. - C: Bois final dégradé après quatorze semaines d'attaque. Lambeaux de couche S_2. MEB.


10 µ
A
B
10 µ
C

D'ailleurs, bien que l'organisation cellulaire du bois attaqué après quatorze semaines soit considérablement perturbée (Pl. IV, C; Pl. V, C), l'aspect des échantillons fait penser à du bois sain. Contrairement à *Coriolus versicolor* où trois mois d'exposition représentait le stade ultime de l'altération, cette période d'exposition ne peut donner lieu qu'à un début d'altération sérieuse. D'ailleurs, NECESSANY (1963) parle de disparition de la cellulose après une forte attaque (supposant donc un temps long) et MEIER (1955) fait ses observations après huit mois d'exposition *in vitro*. Le seul indice permettant de prévoir la formation des alvéoles fibreuses lors de cette observation des phases initiales d'altération, semble être la délignification des fibres en certains points du plan ligneux.

Le bois dégradé par un champignon de pourriture alvéolaire paraît intact en dehors des alvéoles. L'observation des stades initiaux montre qu'il n'en n'est rien car de nombreuses perforations et des traces incrustantes d'hyphes sont observées ça et là dans le plan ligneux qui n'a donc pas gardé toute son intégrité.

7. CONCLUSION

Trametes pini est un champignon lignivore capable de décomposer en premier lieu la lignine et ensuite la cellulose.

Dans cette étude où le bois est confronté au champignon pendant au plus quatorze semaines, nous n'avons pu observer qu'une phase de son action, c'est-à-dire l'assimilation de la lignine. Il semblerait que les enzymes cellulolytiques agissent bien plus tardivement; la cellulose conserve ainsi au bois une certaine intégrité. Comparativement à *Coriolus versicolor* qui dégrade simultanément la lignine et la cellulose dès six semaines d'attaque, l'action destructrice de *Trametes pini* est bien plus lente.

Quelques points particuliers du système d'attaque sont à remarquer :

- *Trametes pini* envahit rapidement les éléments du plan ligneux. Les hyphes colonisatrices sont de deux sortes : les plus larges sont capables de donner lieu à la formation de microhyphes qui pénètrent dans la paroi cellulaire. Toutes les hyphes du champignon peuvent créer des perforations dont les diamètres sont différents.

- L'action lignolytique du champignon apparaît assez rapidement. Vers six semaines d'exposition les microfibrilles de cellulose sont mises à nu dans la paroi du fait de l'assimilation par *Trametes pini* de la lignine incrustante.

- Enfin, par rapport aux deux champignons lignivores étudiés précédemment (*Coriolus versicolor* et *Serpula lacrymans*) l'activité destructrice de ce champignon pendant les trois mois d'attaque *in vitro* est bien moins importante; il semblerait que son action soit plus lente puisque seule la lignine dans le cas présent est dégradée. La cellulose est vraisemblablement atteinte par les enzymes du champignon bien plus tardivement et c'est après sa destruction que doivent apparaître les formes d'altération particulières à la pourriture alvéolaire.

REMERCIEMENTS

Les documents photographiques en microscopie électronique à balayage, ont été réalisés avec la participation technique de Françoise THOMASSIN.

BIBLIOGRAPHIE

DIROL D., 1976 — Étude *in vitro* de la colonisation et de la dégradation structurale du bois de Hêtre par *Coriolus versicolor* (L.) Q. *Revue de Mycol.* 40: 295-317.

DIROL D., 1978 — Étude *in vitro* de la colonisation et de la dégradation structurale du bois d'aubier de Pin sylvestre par la Mérule : *Serpula lacrymans* Schum. ex Fr. S.F. Gray. *Revue de Mycol.* 42: 277-292.

LIESE W., 1970 — The action of fungi and bacteria during wood deterioration. B.W.P.A. Annual convention.

LIESE W., 1970 — Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Ann. Rev. of Phytopathology.* 8: 231-258.

LIESE W. und SCHMID R., 1962 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Abbau des Holzes durch Pilze. *Angew. Bot.* 36 : 291-298.

LIESE W. und SCHMID R., 1966 — Untersuchungen über den Zellwandabbau von Nadelholz durch *Trametes pini. Holz als Roh- und Werkstoff.* Bd 24: 454-460.

MEIER H., 1955 — Uber den Zellwandabbau durch Holzvermorschungspilze und die submikroskopische Struktur von Fichtentracheiden und Birkenholzfasern. *Holz als Roh- und Werkstoff* Bd 13: 313-338.

NECESSANY V., 1963 — Veränderung der Zellwandstruktur bei Tannenholz (*Abies alba* Mill.) durch Pilzeinwirkung. *Holzforschung* 17: 57-60.